



**Seleção de Genótipos de Milho e Arroz mais Eficientes  
Quanto ao Ganho de N Através de Fixação Biológica de N<sub>2</sub>**



---

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
**Agrobiologia**  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

**República Federativa do Brasil**

**Presidente**

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

**Ministro**

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

**Diretor Presidente**

Alberto Duque Portugal

**Diretores**

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

**Chefias da Agrobiologia**

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 73

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

**Seleção de Genótipos de Milho e Arroz mais Eficientes  
Quanto ao Ganho de N Através de Fixação Biológica de N<sub>2</sub>**

Fábio Bueno dos Reis Júnior  
Johanna Döbereiner  
Vera Lúcia Divan Baldani  
Verônica Massena Reis  
Altair Toledo Machado

Seropédica - RJ  
1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa **Agrobiologia**  
Caixa Postal 74505  
23851-970 - Seropédica – RJ  
Telefone: (021) 682-1500  
Fax: (021) 682-1230  
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

**Expediente:**

Revisor: Sebastião Manhães Souto

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix  
Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antônio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

REIS JÚNIOR, F.B. dos; DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; MACHADO, A.T. **Seleção de Genótipos de Milho e Arroz mais Eficientes Quanto ao Ganho de N Através de Fixação Biológica de N<sub>2</sub>**. Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 24p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 73).

ISSN 0104-6187

1. Fixação biológica de nitrogênio (FBN). 2. Milho. 3. Arroz. 4. Seleção genotipa. I. Döbereiner, J., colab. II. Baldani, V.L.D., colab. III. Reis, V.M., colab. IV. Machado, A.T., colab. V. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). VI. Título. VII. Série.

CDD 572.545

# SUMÁRIO

1. RESUMO .....	4
2. INTRODUÇÃO.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS REFERENTES AO ANO DE 1997 .....	10
5. BIBLIOGRAFIA CITADA .....	22

# Seleção de Genótipos de Milho e Arroz mais Eficientes Quanto ao Ganho de N Através de Fixação Biológica de N<sub>2</sub><sup>1</sup>

*Verônica Massena Reis<sup>2</sup>*  
*Vera Lúcia Divan Baldani<sup>2</sup>*  
*Robert Boddey<sup>2</sup>*  
*Segundo Urquiaga<sup>2</sup>*  
*Altair Toledo Machado<sup>2</sup>*  
*Johanna Döbereiner<sup>2</sup>*

## 1. Resumo

Este documento engloba as atividades realizadas no ano de 1997 do subprojeto 04 que pertence ao projeto institucional “Identificação e uso de bactérias diazotróficas em gramíneas e outras plantas não leguminosas”. Este projeto trata das ações de pesquisa que buscam alternativas para a redução do uso de N por diversas culturas tais como a cana-de-açúcar, o capim elefante, o capim *Brachiaria*, e neste caso, para o arroz e o milho, além das palmeiras nativas. Este projeto teve início em 1996, com término em 1999 e é constituído de 6 subprojetos. Para maiores informações sobre o andamento dos subprojetos 01 que estuda as 3 culturas citadas acima, leia o documento de número 75. Já as ações de dendê e pupunha referentes ao subprojeto 03, leia o documento número 74.

## Milho

Visando comparar genótipos de milho promissores quanto à absorção de nitrogênio, produção de grãos e matéria seca e quantificar os ganhos de N através da fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) em solos de baixa disponibilidade deste elemento, conduziu-se um experimento utilizando-se nove genótipos. Para tal, foi utilizado um tanque de concreto (120 m<sup>2</sup> x 0,40 m prof.) preenchido com solo PVA horizonte B, marcado com <sup>15</sup>N. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas na produção de grãos (870 a 2259 kg/ha), matéria seca total (3201 a 6251 kg/ha) e acúmulo de Nitrogênio (22,1 a 39,5 kg/ha). No entanto, não houve diferenças no enriquecimento de <sup>15</sup>N, demonstrando que a

---

<sup>1</sup> O trabalho refere-se ao relatório anual (1997) do subprojeto 01.0.96.031.04, com o mesmo nome.

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica-RJ.

produção e acúmulo de N foram dependentes da capacidade de extração do N do solo por cada genótipo, sem significativa contribuição da FBN na nutrição da cultura. Com o objetivo de verificar as possibilidades do melhoramento genético em milho, para o uso eficiente do nitrogênio, estudos inter e intra populacionais foram realizados. Para o estudo interpopulacional foram realizados três experimentos a nível de campo e um a nível de casa de vegetação. No primeiro e no segundo experimento, foram avaliados oito genótipos, sendo cinco variedades locais (Quarentão, Caiano, Carioca, Catetão e Argentino), uma variedade melhorada para uso eficiente do nitrogênio (Nitroflint) e dois híbridos (P 3210 e XL 560). No primeiro experimento a adubação nitrogenada foi de 20 kg N/ha, e no segundo foi de 80 kg N/ha. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições, e os caracteres avaliados foram produção de grãos, conteúdo do nitrogênio na planta e nos grãos e os índices de eficiência de utilização e de uso. Nesses experimentos, foi possível identificar as variedades Carioca, Caiano, Argentino e Nitroflint, como eficientes e as variedades Quarentão e Catetão como ineficientes. No terceiro experimento a nível de campo e no experimento a nível de casa de vegetação, foram avaliadas as variedades Nitroflint e Catetão, identificadas como contrastantes, em dois níveis de N (10 e 100 kg N/ha). O delineamento experimental utilizado foi o de fatorial com disposição dos tratamentos em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os caracteres avaliados no ensaio de campo foram teor e conteúdo de nitrogênio em diferentes partes da planta, massa seca, peso de grãos e biomassa. Foram determinados ainda, índices de eficiência e atividade das enzimas glutamina sintetase (reação da transferase) e nitrato redutase. Nesse experimento, o conteúdo de nitrogênio dos grãos e total da planta e peso do sabugo foram importantes para caracterizar as variedades, podendo os mesmos servirem como parâmetro auxiliar em programas de melhoramento. Os mecanismos de translocação e a relação fonte/dreno, foram processos importantes para caracterizar a eficiência no uso de nitrogênio. Os componentes de eficiência de uso e de absorção, foram eficientes para caracterizar as variedades no ambiente com baixo nível de N, enquanto os componentes de utilização e de translocação, foram eficientes para caracterizar as variedades em ambos níveis de N. No experimento realizado em casa de vegetação, os caracteres avaliados foram atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase. A atividade das enzimas não foram eficientes para discriminar as variedades em ambos ensaios. Para o estudo intrapopulacional, foram obtidas 200 famílias endogâmicas S1 da variedade Nitroflint e 100 da variedade Catetão. Essas famílias foram avaliadas em dois locais, e o

delineamento utilizado foi o de Látice, com duas repetições. A partir dos dados de produção de grãos, foi possível separar as melhores e piores famílias, que foram utilizadas em um experimento subsequente em casa de vegetação com quatro repetições e quatro regimes de nitrogênio (N1= 75% NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:25% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; N2= 25% NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 75% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; N3= 50% NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 50% NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N4= 5% NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 5% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). O delineamento experimental desse experimento foi o de fatorial com os tratamentos dispostos em blocos ao acaso. Os caracteres avaliados foram atividade das enzimas glutamina sintetase (reação da transferase e da sintetase) e nitrato redutase e massa fresca. A atividade da glutamina sintetase (reação da sintetase) no regime N2 e atividade da nitrato redutase no regime N1, foram eficientes para discriminar as famílias, e portanto, podem ser utilizadas como parâmetros bioquímicos em programas de seleção genética.

## Arroz

Visando selecionar estirpes de *Herbaspirillum spp* mais eficientes na produção de matéria fresca de plântulas de arroz foram instalados dois experimentos onde foram testadas 81 estirpes de *Herbaspirillum*, de diferentes origens, existentes na coleção de cultura do CNPAB. A avaliação foi feita trinta dias após o plantio, através da coleta das plântulas e da determinação do peso da matéria fresca. Neste experimento foi observado um aumento de cerca de 130% no peso das plântulas frescas devido a inoculação das estirpes mais promissoras (Z94 e Z50) comparado com o tratamento controle. Do total de 81 estirpes testadas foram selecionadas as 26 estirpes mais promissoras que, testadas e analisadas como anteriormente, mostraram novamente um aumento no peso fresco das plântulas maior que 100% em relação ao tratamento testemunha, confirmando assim resultados do experimento anterior. Ao final, foram selecionadas sete estirpes mais promissoras do segundo experimento e usadas no experimento 3. Este experimento foi conduzido como os demais porém suplementado com 5 ppm de nitrogênio marcado (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>) em excesso para selecionar a estirpe mais eficiente no processo de fixação de N<sub>2</sub> na associação com a planta de arroz. Os resultados mostraram que a inoculação com a estirpe Z94 produziu uma diluição isotópica de 0,327% no nitrogênio marcado em relação à testemunha (0,718%) indicando que até 54% do nitrogênio das plântulas eram provenientes da fixação biológica de N<sub>2</sub>. Estes resultados foram confirmados em um novo experimento. Dezesesseis genótipos de arroz foram plantados em um tanque de concreto preenchido com solo marcado com <sup>15</sup>N. Os resultados mostraram que as plantas estavam colonizadas com uma mistura de bactérias diazotróficas tanto nas raízes como na parte



aérea. Os resultados de peso da matéria seca da parte aérea e dos grãos variou de forma significativa entre os genótipos testados. Os resultados de acúmulo de N, e % de  $^{15}\text{N}$  em excesso ainda estão sendo processados.

## 2. Introdução

Torna-se desnecessário ressaltar a grande importância socio-econômica do milho e do arroz no mundo. Os programas de melhoramento destas culturas ao longo da história, produziram materiais de alta resposta a adubações químicas, selecionados para os mais diversos solos e condições climáticas. Entretanto, no caso brasileiro, 70% da produção do milho advém de pequenos e médios agricultores. Esta agricultura destaca-se pelo seu baixo rendimento em reflexo a uma utilização mínima de fertilizantes. A recomendação para essas propriedades e a utilização de variedades onde o próprio agricultor selecione as suas sementes com base na planta que apresente os melhores resultados de produção. Isto gerou o aparecimento de uma infinidade de materiais com uma grande variabilidade genética. A situação atual do milho no Brasil é de uma agricultura dividida entre o milho híbrido, selecionado para altas produtividade e plantado em grandes propriedades, e o chamado material nativo, de produtividade relativamente baixa mas com custo de produção reduzido.

Dentre os fertilizantes usados, o adubo nitrogenado é o que mais onera o custo da adubação, chegando a representar cerca de 40% do custo total de produção da cultura do milho. A fixação biológica é uma alternativa de relevante importância no suprimento (no todo ou parcial) do nitrogênio necessário da cultura. A pesquisa sobre a associação de bactérias diazotróficas com gramíneas tem avançado no caminho de um maior conhecimento das interações entre o genótipo da planta e a seletividade da população microbiana do sistema solo/planta. Sabe-se que bactérias do gênero *Azospirillum* são comumente encontradas habitando as raízes de gramíneas como o milho e o arroz. Certas estirpes destas bactérias infectam as raízes, proliferando nos espaços intra e intercelular bem como nos vasos do xilema. Baseado na capacidade de colonizar o interior das raízes, foi sugerida uma certa especificidade na infecção de raízes de cereais por *Azospirillum* sp. (Baldani & Dobereiner, 1980). *A. lipoferum* parece infectar preferencialmente raízes de milho (planta  $\text{C}_4$ ) e *A. brasilense*, o trigo e arroz. Respostas à inoculação destas gramíneas depende do uso de estirpes competitivas que se estabeleçam e se multipliquem nas raízes, penetrando nas plantas e colonizando a parte

aérea. Estes resultados foram obtidos usando estirpes isoladas do interior de raízes de trigo (Boddey et al., 1986).

Entretanto, as respostas à inoculação descritas na literatura, são bastante. Esta variação de resultados reflete a influencia dos diversos genótipos testados, as mais variadas formas de inoculação e as mais diversas estirpes usadas. Nenhum estudo conclusivo sobre os efeitos destas inoculações foi realizado, principalmente devido à falta de uniformização dos métodos e ao pouco conhecimento das inter-relações da planta/bactéria.

Embora os efeitos da inoculação de cereais sejam bastante variáveis, existe um grande numero de resultados de aumentos de 10 a 50% de produtividade devido à inoculação de milho. Em um trabalho recente, utilizando 12 genótipos de milho, houve uma grande variação de resposta da planta a inoculação (Dobereiner & Garcia-Salomone, 1995). Em vários países como o México, Argentina, Bélgica entre outros, são usados inoculantes de *Azospirillum* em plantios de milho (Okon, 1994). Estes resultados demonstram a viabilidade do uso destes microrganismos benéficos e pesquisas de seleção de estirpes e de genótipos mais eficientes, são de grande importância para a redução do uso de adubos nitrogenados nestas plantas.

### **3. Material e Métodos**

#### **Milho**

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP em 1995. As plantas foram crescidas em vasos de 5 litros com vermiculita onde foram cultivados inicialmente 10 plantas por vaso da variedade Nitroflint. A inoculação foi efetuada no plantio, colocando-se 0,5 gramas de inoculante por semente. Após 12 dias do plantio, foi feito o desbaste, permanecendo 4 plantas sadias por vaso e a seguir foi iniciada a irrigação com solução nutritiva. Foram aplicados 250 mL de solução duas vezes por semana, e diariamente, os pratos sob os vasos foram completados com água. A coleta dos dados foi iniciado entre 21 e 25 dias após o plantio. Foram anotados os seguintes caracteres: atividade das enzimas glutamina sintetase (reação da transferase e sintetase) e redutase do nitrato, peso da matéria fresca e contagem de bactérias diazotróficas.

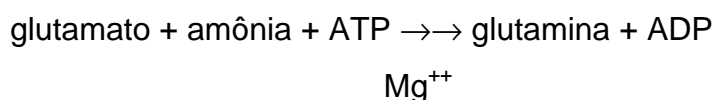
Duas soluções de Hoagland's modificadas (pH médio de 5,1 - Hoagland & Arnon, 1950), foram usadas para dois regimes de N (100% NO<sub>3</sub> e 10% NO<sub>3</sub>). A partir do preparo

de soluções estoque, foram feitas duas soluções diluídas 1:1: solução I com 100% de N na forma de  $\text{NO}_3$  e solução II, com todos os nutrientes menos o nitrogênio. Na Tabela 1 e 2, encontram-se as concentrações e as formas de cada nutriente utilizados na solução nutritiva para os dois regimes de N.

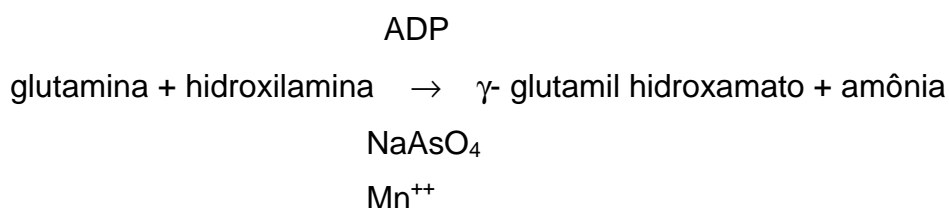
Os teores de nitrogênio foram obtidos pela digestão e o conteúdo de nitrogênio foi determinado na parte aérea e nos grãos, a partir do produto de nitrogênio (%) e pelo peso seco (g), sendo o resultado apresentado em gramas, feitas as devidas transformações de unidades.

O método para estimar a atividade da nitrato redutase (NR) *in vivo* foi descrito por Reed et al., (1980). A atividade foi referida em micromoles de nitrito formado por hora, por grama de matéria fresca ( $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ).

Para avaliar a atividade da glutamina sintetase foi utilizado o método descrito por Rhodes et al., (1975). A atividade pode ser medida pela reação sintetase dosando-se a formação de  $\gamma$ - glutamil hidroxamato a partir de glutamato e hidroxilamina (que substitui amônia), de acordo com a reação:



A reação transferase, que é o inverso da reação sintetase, é outro modo pelo qual pode ser avaliada a glutamina sintetase. Nesta reação, a enzima é incubada com glutamina e hidroxilamina, dosando-se a formação de  $\gamma$ - glutamil hidroxamato:



O resultado foi expresso em  $\mu\text{moles}$  do produto formado por hora e por grama de tecido, levando-se em consideração que 1  $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato nas condições de ensaio mostra uma absorbância de 0,34.

O experimento 2 foi inoculado com 4 estirpes de bactérias diazotróficas. O inoculante foi preparado usando culturas crescidas por 48 horas em diferentes meios dependendo da espécie, LGI (Am76- *A.amazonense*); JNFb (HS136- *Herbaspirillum seropedicae*) e NFb (S82 e CMS22 - *A.lipoferum*). A descrição dos meios é detalhado por Döbereiner et al., (1995) e na forma de turfa moída.

A contagem dos microorganismos na raiz e parte aérea do milho foi realizado usando o método do número mais provável (Döbereiner et al., 1995).

Os ensaios foram analisados como blocos ao acaso com dois fatores (adubação nitrogenada e inoculação com mistura de bactérias diazotróficas). Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância com aplicação do teste F para verificar a significância com 5 e 1% de probabilidade. Para os valores médios dos caracteres estudados foi aplicado o DMS (diferença mínima significativa) e também foi realizado estudo de correlação entre alguns caracteres de interesse usando-se o teste T.

## **Arroz**

A seleção dos genótipos de arroz utilizou 16 no primeiro ano e 40 genótipos no segundo ano. Os experimentos de arroz foram conduzidos em um tanque de concreto com as dimensões de 15 X 6 m. No caso do arroz, foram feitas avaliações a cada 30 dias utilizando-se amostras de tecido vegetal e do solo da rizosfera. Os resultados foram correlacionados com as análises de matéria fresca e seca, produção de grãos e teor de N nos diversos tecidos.

Para a contagem das bactérias diazotróficas, as amostras foram maceradas em tampão fosfato salino e diluições seriadas foram inoculadas em diversos meios semi-sólidos, de acordo com o grupo de bactérias que se deseja identificar seguindo a metodologia descrita por Döbereiner et al., (1995).

Também foram testadas diversas estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em um experimento de vaso marcado com 15-N onde foram avaliados diversos parâmetros como peso fresco e seco, N-total, N percentual, 15N em excesso e ao final o quando de N foi derivado da FBN. Esta foi a segunda etapa para a seleção de estirpes mais eficientes que poderão ser usadas em inoculantes comerciais no futuro.

## **4. Resultados referentes ao ano de 1997**

### **Experimento 1: Interação de níveis de Nitrogênio (N) e fósforo (P) em diferentes variedades de milho**

Nesse experimento avaliou-se diferentes variedades de milho em combinações de níveis altos e baixos de P e N, em condições de campo, em solo Latossolo Vermelho Escuro, na área experimental da Mita Pesquisa Agrícola em Uberlândia, MG. As variedades avaliadas foram 3 melhoradas (Nitrodente, Nitroflint e BR 106) e 5 locais (Caiano, Carioca, Antigo Maia, Pedra Dourada e Catetão). Foram realizados quatro

experimentos, sendo um (1) com nível alto de N (120 kg/ha) e alto de P (70 Kg P/ha), o segundo (2) com nível alto de N e baixo de P (17,5 kg/ha), o terceiro (3) com nível baixo de N (20 kg/ha) e alto de P e o quarto (4) com nível baixo de N e P. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Os parâmetros avaliados foram produção de grãos e teor e conteúdo de N e P nos grãos. Para o caráter produção de grãos (Tabela 1) a variedade Nitrodente apresentou-se superior nos ensaios com alto níveis de nitrogênio (1 e 2), nos demais ensaios não houveram diferenças significativas entre os materiais. Para teor de N e P (Tabela 2), as variedades Catetão e BR 106 foram as que concentraram, respectivamente, os maiores e menores quantidades de N nos grãos. Quanto ao teor de P, na média dos quatro ensaios BR 106 obteve o menor valor e Catetão o maior. Para o conteúdo de N e P nos grãos (Tabela 3) nos quatro ensaios não verificou-se diferenças significativas entre as variedades nos ensaios 1 e 3, mas a variedade Nitrodente se apresentou como o material que mais acumulou tanto N quanto P nos ensaios com alta disponibilidade de N, enquanto o Catetão foi o que mais acumulou ambos os nutrientes sob condições de baixa disponibilidade de N.

Tabela 1. Produção de grãos das variedades de milho avaliadas em 4 ensaios com combinações de níveis de N e P. Média de 4 repetições.

Variedades	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Média variedades
<b>kg/ha</b>					
Nitroflint	4160 b	3737 b	3330 a	2360 a	3397 e
Nitrodente	5765 a	5425 a	3967 a	2922 a	4520 a
BR 106	4790 ab	4692 ab	4130 a	3460 a	4268 b
Caiano	4487 ab	4675 ab	4045 a	2905 a	4028 c
Carioca	4725 ab	4590 ab	3490 a	3022 a	3957 c
Antigo Maya	4532 ab	4597 ab	3667 a	3347 a	4036 c
P. Dourada	4430 ab	4165 b	3322 a	3082 a	3750 d
Catetão	4275 b	4297 ab	3670 a	3832 a	4019 c
<b>Média ensaios</b>	4646 A	4523 B	3703 C	3117 D	
DMS <sub>1</sub>	1305	1080	764,5	1310	
DMS <sub>2</sub>	141				
DMS <sub>3</sub>	94				
CV (%)	19,11	16,24	14,04	28,57	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. CV (%) Coeficiente de variação. DMS<sub>1, 2, 3</sub>, diferença mínima significativa a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente, para as variedades dentro de cada experimento, para a média das variedades e para a média dos ensaios.

(1) com nível alto de N (120 kg/ha) e alto de P (70 Kg P/ha), o segundo (2) com nível alto de N e baixo de P (17,5 kg/ha), o terceiro (3) com nível baixo de N (20 kg/ha) e alto de P e o quarto (4) com nível baixo de N e P

Tabela 2. Teor de N e P nos grãos das variedades de milho avaliadas em 4 ensaios com combinações de níveis de N e P. Média de 4 repetições.

Variedades	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Média variedades
<b>Teor de N (g N/kg)</b>					
Nitroflint	17,29 abc	17,82 ab	16,65 abc	16,95 ab	17,18 c
Nitrodente	15,76 d	16,70 bc	16,04 bc	15,81 a	16,08 e
BR 106	15,46 d	15,33 d	15,08 c	14,16 c	15,01 f
Caiano	16,65 bcd	16,32 cd	15,16 c	15,74 b	15,97 e
Carioca	16,17 cd	16,93 bc	16,78 abc	15,89 b	16,44 d
Antigo Maya	16,30 cd	16,96 bc	16,73 abc	16,22 b	16,55 d
P. Dourada	18,02 ab	18,48 a	17,72 ab	16,90 ab	17,78 b
Catetão	18,30 a	18,20 a	18,02 a	18,00 a	18,07 a
<b>Média</b>	16,71 B	17,09 A	16,52 C	16,21 D	
<b>ensaio</b>					
DMS <sub>1</sub>	1,36	1,04	1,74	1,28	
DMS <sub>2</sub>	0,15				
DMS <sub>3</sub>	0,10				
CV (%)	5,52	4,15	7,17	5,38	
<b>Teor de P (g P/kg)</b>					
Nitroflint	5,59 ab	5,80 abc	6,97 a	6,49 a	6,21 b
Nitrodente	4,85 b	5,72 bc	5,45 c	5,79 abc	5,45 e
BR 106	4,63 b	5,00 c	5,43 c	4,97 c	5,01 g
Caiano	5,13 ab	5,43 c	5,54 c	5,66 abc	5,44 e
Carioca	4,95 ab	5,87 abc	5,76 bc	5,90 ab	5,62 d
Antigo Maya	4,92 ab	5,76 bc	5,21 c	5,36 bc	5,31 f
P. Dourada	5,17 ab	6,48 ab	5,89 bc	6,27 a	5,96 c
Catetão	5,87 a	6,65 a	6,62 ab	6,33 a	6,37 a
<b>Média</b>	5,14 B	5,84 A	5,86 A	5,85 A	
<b>ensaio</b>					
DMS <sub>1</sub>	0,90	0,80	0,82	0,82	
DMS <sub>2</sub>	0,08				
DMS <sub>3</sub>	0,06				
CV (%)	11,93	9,32	9,53	9,57	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. CV (%) Coeficiente de variação. DMS<sub>1, 2, 3</sub>, diferença mínima significativa a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente, para as variedades dentro de cada experimento, para a média das variedades e para a média dos ensaios. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

(1) com nível alto de N (120 kg/ha) e alto de P (70 Kg P/ha), o segundo (2) com nível alto de N e baixo de P (17,5 kg/ha), o terceiro (3) com nível baixo de N (20 kg/ha) e alto de P e o quarto (4) com nível baixo de N e P

Tabela 3. Conteúdo de N e P nos grãos das variedades de milho avaliadas em 4 ensaios com combinações de níveis de N e P. Média de 4 repetições.

Variedades	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Média variedades
<b>Conteúdo de N (kg N/ha)</b>					
Nitroflint	71,88 a	66,64 b	55,06 a	40,36 b	58,49 c
Nitrodente	90,87 a	90,64 a	62,93 a	46,41 ab	72,71 a
BR 106	73,12 a	70,91 ab	62,47 a	49,65 ab	64,04 b
Caiano	74,76 a	76,31 ab	61,49 a	45,29 b	64,46 b
Carioca	76,33 a	77,74 ab	58,81 a	48,03 ab	65,23 b
Antigo Maya	76,76 a	78,48 ab	61,32 a	54,00 ab	66,89 b
P. Dourada	80,05 a	77,05 ab	58,75 a	52,00 ab	66,96 b
Catetão	78,23 a	78,43 ab	66,19 a	69,06 a	72,98 a
<b>Média ensaios</b>	77,38 A	77,03 A	60,88 B	50,60 C	
DMS <sub>1</sub>	21,51	18,38	12,91	20,68	
DMS <sub>2</sub>	1,56				
DMS <sub>3</sub>	1,56				
CV (%)	18,91	16,23	14,43	27,80	
<b>Conteúdo de P (kg P/ha)</b>					
Nitroflint	23,33 a	21,80 b	23,13 a	15,27 b	20,88 d
Nitrodente	27,83 a	30,79 a	21,72 a	17,05 ab	24,35 b
BR 106	22,12 a	22,93 ab	22,45 a	17,56 ab	21,27 cd
Caiano	22,99 a	25,47 ab	22,38 a	15,82 b	21,66 cd
Carioca	23,31 a	27,05 ab	19,84 a	17,83 ab	22,01 cd
Antigo Maya	22,30 a	26,78 ab	19,08 a	17,88 ab	21,51 cd
P. Dourada	23,64 a	27,06 ab	19,57 a	19,43 ab	22,42 c
Catetão	25,19 a	28,74 ab	24,19 a	24,28 a	25,60 a
<b>Média ensaios</b>					
DMS <sub>1</sub>	8,02	7,53	5,47	7,34	
DMS <sub>2</sub>	0,84				
DMS <sub>3</sub>	0,57				
CV (%)	22,88	19,46	17,25	27,51	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. CV (%) Coeficiente de variação. DMS<sub>1, 2, 3</sub>, diferença mínima significativa a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente, para as variedades dentro de cada experimento, para a média das variedades e para a média dos ensaios. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

(1) com nível alto de N (120 kg/ha) e alto de P (70 Kg P/ha), o segundo (2) com nível alto de N e baixo de P (17,5 kg/ha), o terceiro (3) com nível baixo de N (20 kg/ha) e alto de P e o quarto (4) com nível baixo de N e P

## Experimento 2: Efeito da inoculação em milho com bactérias diazotróficas, no incremento da produção de grãos, absorção de nitrogênio e atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase

Para estudar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na variedade Nitroflint, dois experimentos foram realizados, sendo o primeiro a nível de campo e o segundo em casa de vegetação. Utilizou-se dois fatores de avaliação, inoculação com bactérias diazotróficas (com e sem) e adubação nitrogenada (alto e baixo). Os caracteres avaliados para o experimento de campo foram: produção de grãos, conteúdo de nitrogênio nos

grãos e na planta, e atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) (reação da transferase). No ensaio de casa de vegetação os caracteres avaliados foram massa fresca (MF), atividade das enzimas NR e GS (reação da transferase e sintetase) e contagem de bactérias em três meios denominados LGI (*A. amazonense*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae*) e NFb (*A. Lipoferum*) na parte aérea e raízes. No experimento de campo, a inoculação com bactérias diazotróficas teve efeito na produção de grãos e no conteúdo de nitrogênio dos grãos (Tabela 4). Atividade da GS reação da transferase e MF foram influenciados pela inoculação (Tabela 5). Na Tabela 6, encontra-se a contagem de bactérias. Correlação entre os meios de crescimento e os caracteres para os caracteres com alto e baixo nível de N, são apresentados nas Tabelas 7 e 8. Na Tabela 7, observa-se que o meio LGI correlacionou-se com GSR tanto na parte aérea como na raiz e na Tabela 8, pode-se verificar que o meio LGI correlacionou-se com GSTR de forma significativa tanto na parte aérea como na raiz. Os dados apresentados, indicam a importância das bactérias do tipo *A. amazonense* (crescidas no meio LGI) no incremento da atividade da GS na raiz.

Tabela 4. Valores médios de produção de grãos (Pg) em kg/ha, conteúdo de nitrogênio total da planta (Ntp) e dos grãos (Ng) em kg N/ha e atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e nitrato redutase (NR) em  $\mu\text{mol/hora/grama}$  de tecido. Ensaio em bloco ao acaso, com dois níveis de adubação nitrogenada (10 e 100 kg N/ha) e com e sem inoculação com bactérias diazotróficas, dados médios de três repetições. Seropédica, 1995.

Tratamentos	Pg	Ntp	Ng	GS	NR
Com inoculação e 10 kgN/ha	2780	16,02	40,89	399	1,28
Com inoculação e 100 kgN/ha	5790	21,23	95,13	403	1,95
Sem inoculação e 10 kgN/ha	1400	16,80	22,36	456	1,21
Sem inoculação e 100 kgN/ha	4830	24,58	73,73	455	1,70
DMS (5 %)	2010	6,32	31,21	ns	Ns
Média dos tratamentos com inoculação	4291*	18,63	68,01**	401	1,61
média dos tratamentos sem inoculação	3118	20,69	48,05	455	1,45
Média dos ambientes com 10 kgN/ha	2096	16,41	31,63	427	1,24
Média dos ambientes com 100 kgN/ha	5313***	22,90**	84,43***	429	1,83

\* Significativo a 10 % pelo teste F

\*\* Significativo a 5 % pelo teste F

\*\*\* Significativo a 1 % pelo teste F



Tabela 5. Valores médios de produção de massa fresca (MF) em grama/planta e atividade das enzimas glutamina sintetase a partir da reação da transferase realizada na folha (GSTF) e na raiz (GSTR) e a partir da reação da sintetase na folha (GSSF) e na raiz (GSSR) e nitrato redutase (NR) em  $\mu\text{mol/hora/gramas}$  de tecido fresco. Ensaio em blocos ao acaso com dois níveis de nitrogênio (10 e 100% N) e tratamentos com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. Dados médios de três repetições

Tratamentos	MF	GSTF	GSTR	GSSF	GSSR	NR
Com inoculação e 10 kgN/ha	1,06	139	181	89	63	0,12
Com inoculação e 100 kgN/ha	2,28	108	194	197	83	1,15
Sem inoculação e 10 kgN/ha	0,76	150	112	116	56	0,26
Sem inoculação e 100 kgN/ha	1,92	119	206	234	79	1,07
DMS (5%)	0,48	32,33	28,30	99,83	15,90	0,62
Média dos tratamentos com inoculação	1,67*	124	187*	143	76	0,63
Média dos tratamentos sem inoculação	1,34	135	159	175	67	0,66
Média do nível baixo de N	0,91	145*	146	102	60	0,19
Média do nível alto de N	2,10**	114	200**	215**	84*	1,10*

\* Significativo a 5 % pelo teste F

\*\* Significativo a 1 % pelo teste F

Tabela 6. Número de bactérias crescidas em três diferentes meios de cultura, denominados: LGI (*A. amazonense*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae*) e NFb (*A. lipoferum*) em número de células/ml, realizados na parte aérea e nas raízes de milho. Ensaio em blocos ao acaso com três repetições.

Tratamentos	Parte aérea			Raiz		
	LGI	JNFb	NFb	LGI	JNFb	NFb
Com inoculação <sup>1</sup>	$1,3 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Sem inoculação	0,00	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$

<sup>1</sup> Inoculação realizada com uma mistura de bactérias diazotróficas

Tabela 7. Correlação entre o número de bactérias crescidas nos meios NFb, LGI e JNFb da parte aérea e raiz de milho com os caracteres nitrato redutase (NR), glutamina sintetase reação de transferase na folha (GSTF), na raiz (GSTR), glutamina sintetase reação de síntese na folha (GSSF), na raiz (GSSR) e matéria fresca (MF), para o tratamento com inoculação e alto nível de N (100%N).

Parte aérea	NR	GSTF	GSTR	GSSF	GSSR	MF
NFb	0,205	-0,267	-0,181	-0,453	0,429	0,899**
LGI	-0,141	-0,183	-0,270	-0,152	0,572	0,482
JNFb	0,434	-0,377	-0,296	0,577	0,035	0,798*
Raiz						
NFb	0,242	-0,750	-0,797*	-0,250	0,114	0,656
LGI	0,178	-0,322	-0,250	-0,453	0,608	0,560
JNFb	0,379	-0,683	-0,683	-0,250	0,023	0,694

\* Significativo a 5 % pelo teste t

\*\* Significativo a 1% pelo teste t

Tabela 8. Correlação entre o número de bactérias crescidas nos meios NFb, LGI e JNFb na parte aérea e nas raízes de milho, com os caracteres nitrato redutase (NR), glutamina sintetase reação de transferase na folha (GSTF), na raiz (GSTR), glutamina sintetase reação de síntese na folha (GSSF), na raiz (GSSR) e matéria fresca (MF), para o tratamento com inoculação e baixo nível de N (10 %N).

Parte aérea	NR	GSTF	GSTR	GSSF	GSSR	MF
NFb	-0,770	-0,446	0,617	-0,580	0,398	0,874*
LGI	-0,496	-0,375	0,779*	-0,533	0,352	0,790*
JNFb	-0,501	-0,722	0,652	-0,394	0,094	0,722
Raiz						
NFb	-0,201	-0,330	0,298	-0,852*	-0,269	0,411
LGI	-0,631	-0,603	0,834*	-0,446	0,341	0,727
JNFb	-0,256	-0,560	0,461	-0,676	-0,220	0,494

\*Significativo a 5 % pelo teste t

### Quantificação da FBN associada com a cultura de arroz irrigado

As avaliações a cerca da seleção de genótipos de arroz eficientes para a alta FBN começaram em 1989 e desde então, inúmeros genótipos vem sendo testados, ao mesmo tempo, que genótipos já testados vem sendo utilizados de forma que seja possível trabalhar com um padrão comparativo de eficiência da FBN, abaixo segue resultado dos últimos 2 anos de trabalho.

### Experimento nº 1. Quantificação da FBN em 40 genótipos de arroz inundado, em solo marcado com $^{15}\text{N}$ , através da técnica de diluição isotópica de $^{15}\text{N}$ - Rendimento de grãos, produção de matéria seca e índice de colheita:

Ano 95/96

O estudo foi desenvolvido na Embrapa-Agrobiologia, Km47-Seropédica-Rio de Janeiro. Nesta pesquisa trabalhou-se com genótipos de arroz irrigado, que vem sendo selecionados para solos pobres e que têm sido considerados promissores para alta FBN em estudos anteriores (Urquiaga et al., 1991), e novos genótipos fornecidos pela Embrapa-CNPAF.

Nesta pesquisa, os 16 genótipos estudados foram: BG 90-2, CNA 6444, CNA 6750, CNA 6807, METICA 1, MG 1, CNA 7543, CNA 6808, CNA 8033, CNA 7857, CNA 7545, CNA 8041, CNA 7556, CNA 7971, CNA 7553 e IAC 4440, sendo este último considerado, em estudos anteriores, como referência de mais baixa eficiência para a FBN. A instalação do experimento ocorreu em 02/12/95. Neste experimento, os genótipos de arroz foram semeados em um tanque de 120m<sup>2</sup> (20 x 6 x 0.6m), preenchido com solo PVA até 40cm, pobre em N, com marcação estável de  $^{15}\text{N}$ . Fez-se adubação contendo calcário, fósforo, potássio e micronutrientes, para que o nutriente limitante fosse somente o nitrogênio. A área do tanque foi dividida em 8 blocos de 15m<sup>2</sup> cada. As parcelas constaram de 1 linha de planta de 3m de comprimento e espaçadas 0.25m entre linhas, com densidade de

semeadura de 100 sementes por metro linear. Na colheita final, as plantas foram separadas em grão e palha, nos quais foram determinadas, além da produção de matéria seca e rendimento de grão, os teores de N total e enriquecimento de  $^{15}\text{N}$ , onde as amostras foram preparadas pelo método de Rittenberg. A fração de N das plantas proveniente da FBN foi calculada pela técnica da Diluição Isotópica de  $^{15}\text{N}$  (Chalk, 1985). O delineamento experimental escolhido foi do tipo: blocos ao acaso com 8 repetições.

Houve diferença significativa entre os genótipos em relação ao rendimento de grãos, acúmulo de matéria seca total e índice de colheita de grãos. As produtividades equivalentes dos genótipos variaram de 0.5 a 2.9 t/ha. Os genótipos CNA 8033, CNA 7556, IAC 4440 e BG 90-2 obtiveram os maiores rendimentos de grãos: 2.7 a 2.9 t/ha (Tabela a). A cultivar CNA 6750 obteve o pior rendimento (0,5 t/ha) do experimento (Tabela a). O acúmulo de matéria seca total acompanhou o rendimento de grãos, variando de 4.6 a 7.0 t/ha. Analisando o índice de colheita de grãos (IC), observou-se que os genótipos em estudo diferiram grandemente na eficiência de produção de grãos. Os genótipos mais eficientes foram: CNA 7971 e CNA 8033, com 42%, e a considerada mais ineficiente foram os genótipos CNA 6750, Metica 1 e CNA 7543, com valores menores que 24% (Tabela a).

Tabela a. Produção de matéria seca, rendimento de grãos e índice de colheita de 16 genótipos de arroz irrigado (95/96).

Genótipo	Matéria seca total t/ha	Palha seca total t/ha	Rendimento de grãos (14%) t/ha	Índice de colheita %	Ciclo
CNA 7543	6.283 abc	4.938 a	1.533 d	22.9 e	108
CNA 6808	5.863 abc	4.168 ab	1.932 bcd	28.4 cde	110
CNA 8033	5.746 abc	3.347 ab	2.735 a	41.7 a	116
CNA 7857	6.214 abc	4.170 ab	2.330 abc	34.2 abcd	120
CNA 7545	5.720 abc	3.466 ab	2.569 ab	39.2 ab	112
CNA 8041	6.161 abc	4.010 ab	2.452 ab	35.0 abcd	101
CNA 7556	6.612 ab	4.158 ab	2.798 a	36.7 abc	124
CNA 7971	5.368 abc	3.121 b	2.562 ab	41.8 a	101
CNA 7553	6.365 abc	4.104 ab	2.578 ab	35.0 abcd	127
IAC 4440	6.936 a	4.455 ab	2.829 a	36.0 abc	138
BG 90-2	7.039 a	4.475 ab	2.923 a	36.3 abc	123
MG 1	6.270 abc	4.298 ab	2.248 abcd	31.2 bcde	122
METICA 1	5.993 abc	4.595 ab	1.594 cd	24.4 e	138
CNA 6807	4.987 bc	3.650 ab	1.524 d	26.6 de	135
CNA 6750	4.622 c	4.152 ab	0.5359 e	10.3 f	132
CNA 6444	6.640 ab	4.282 ab	2.688 ab	35.5 abcd	120
C.V. (%)	17	23	19	16	-----

Ano 96/97:

Continuando a identificação de genótipos de arroz irrigado eficientes para FBN, foi instalado em 03/10/96 um novo ensaio semelhante ao do ano anterior, utilizando agora os 40 genótipos seguintes: SC 138, CNA 8041, PR 349, CNA 8003, CNA 7204, LIGEIRO VERMELHO, CNA 6807, IAC 1289, IAC 4440, CNA 7556, BG 90-2, CICA 8, CNA 8242, CNA 8262, CNA 8284, IAPAR 58, SETENTÃO, CNA 7543, CNA 6808, CNA 8263, CNA 6444, CNA 8244, PR 380, CNA 7857, CNA 8245, CNA 8277, CNA 7545, METICA 1, CNA 8294, IAC 47, CNA 8033, IR-42, GUARANY, JAVAÉ, PR 498, MG 1, CNA 8369, BR IRGA 409, CNA 6750 e CNA 7553, com 4 repetições de cada genótipo.

Em relação ao rendimento de grãos, houve grande diferença entre os genótipos, que produziram até ao equivalente a 3.6 t/ha, destacando-se os genótipos: BR IRGA 409, PR349 e IAC 1289 (tabela b). O acúmulo de matéria seca total acompanhou o rendimento de grãos, destacando os genótipos: BR IRGA 409 e BG 90-2, com o equivalente a mais de 7.5t/ha. Observando o índice de colheita, 13 genótipos obtiveram valores maiores que 40%, isto é, mais que 40% da matéria seca total foram destinados para a produção de grãos, enquanto que 3 genótipos obtiveram valores menores que 10%, considerados insatisfatórios (tabela b). Considerando que foram feitas 3 colheitas após a aplicação no solo de adubos nitrogenados do equivalente a 10 kgN/ha (em 1994), os rendimentos de grãos foram satisfatórios nestas 2 colheitas em que não foram aplicados adubos nitrogenados. Isto confirma que alguns genótipos podem ser utilizados em solos pobres em nitrogênio.

Tabela b. Produção de matéria seca total, rendimento de grãos e índice de colheita de 40 genótipos de arroz irrigado (96/97).

Genótipo	Matéria seca total t/ha	Palha seca total t/ha	Rendimento de grãos 14% t/ha	Índice de colheita (%)	Ciclo
SC 138	7.224 abc	4.796 abcdef	2.768 abcd	33.6 ab	140
CNA 8041	5.941 bcd	3.632 defghi	2.632 abcd	38.8 ab	105
PR 349	7.057 abc	4.041 bcdefgh	3.438 ab	42.6 a	122
CNA 8003	6.331 abcd	3.598 defghi	3.116 abc	43.1 a	119
CNA 7204	6.197 abcd	3.505 defghi	3.069 abcd	43.5 a	125
Lig. Vermelho	3.200 ef	2.522 hijk	0.772 ghi	20.9 bcde	86
CNA 6807	4.583 de	3.975 bcdefgh	0.693 ghi	11.2 cde	145
IAC 1289	7.081 abc	3.986 bcdefgh	3.529 ab	43.7 a	110
IAC 4440	6.411 abcd	4.772 abcdef	1.869 defg	25.6 abcd	144
CNA 7556	6.638 abc	4.113 bcdefgh	2.879 abcd	37.8 ab	130
BG 90-2	8.110 a	5.355 abc	3.140 abc	34.0 ab	127
CICA 8	2.928 ef	2.829 ghijk	0.088 i	02.5 e	138
CNA 8242	5.580 bcd	3.258 fghij	2.648 abcd	41.8 a	104
CNA 8262	6.080 abcd	3.703 cdefghi	2.708 abcd	39.1 ab	105
CNA 8284	5.979 bcd	3.823 bcdefgh	2.458 abcde	36.1 ab	105
IAPAR 58	6.694 abc	4.215 abcdefg	2.826 abcd	37.0 ab	124
Setentão	3.031 ef	2.132 ijk	1.025 fghi	29.8 abcd	85
CNA 7543	5.545 cd	3.526 defghi	2.302 bcde	37.1 ab	106
CNA 6808	5.746 bcd	3.404 efghi	2.669 abcd	40.7 ab	108
CNA 8263	6.581 abcd	4.068 bcdefgh	2.865 abcd	38.2 ab	105
CNA 6444	6.811 abc	4.340 abcdefg	2.817 abcd	36.3 ab	125
CNA 8244	5.625 bcd	3.251 fghij	2.706 abcd	42.4 a	103
PR 380	5.655 bcd	3.211 fghij	2.786 abcd	43.2 a	128
CNA 7857	6.843 abc	4.588 abcdef	2.570 abcde	33.3 ab	127
CNA 8245	6.747 abc	3.862 bcdefgh	3.289 abc	42.7 a	106
CNA 8277	5.919 bcd	3.440 efghi	2.826 abcd	42.0 a	109
CNA 7545	6.013 bcd	3.844 bcdefgh	2.473 abcde	36.1 ab	110
METICA 1	5.584 bcd	5.032 abcde	0.629 hi	09.8 de	143
CNA 8294	6.259 abcd	3.806 bcdefgh	2.796 abcd	39.2 ab	105
IAC 47	2.949 ef	1.725 jk	1.395 efgh	41.8 a	129
CNA 8033	6.296 abcd	3.718 cdefghi	2.940 abcd	40.9 ab	126
IR-42	7.051 abc	5.132 abcd	2.188 cdef	27.2 abcd	155
Guarany	1.735 f	1.196 k	0.615 hi	31.3 abc	110
Javaé	6.308 abcd	3.821 bcdefgh	2.835 abcd	39.5 ab	106
PR 498	7.434 abc	4.582 abcdef	3.250 abc	38.9 ab	105
MG 1	7.450 abc	5.401 ab	2.336 bcde	27.5 abcd	129
CNA 8369	6.863 abc	4.516 abcdef	2.675 abcd	34.2 ab	131
BR IRGA 409	7.593 ab	4.411 abcdefg	3.627 a	41.9 a	104
CNA 6750	6.178 abcd	5.871 a	0.350 hi	05.0 e	145
CNA 7553	6.415 abcd	4.040 bcdefgh	2.707 abcd	37.0 ab	132
C.V. (%)	12	15	18	20	

As análises de N total e enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  dos experimentos de 95/96 e 96/97 serão realizadas simultaneamente no espectrômetro de massa, após o mês de fevereiro, quando o aparelho começar a funcionar.

## Contagem de bactérias diazotróficas

O objetivo deste trabalho foi quantificar, identificar e isolar as bactérias diazotróficas presentes em 10 dos genótipos de arroz irrigado utilizados neste experimento. Foram feitas 3 coletas de amostras de parte aérea e raiz de plantas de arroz para análises

microbiológicas. Essas amostras, nas quantidades de 10g, foram lavadas e trituradas em liquidificador com solução salina (Döbereiner et al., 1995). Foram feitas contagens de bactérias utilizando o método do número mais provável (NMP) com 3 frascos por diluição, utilizando as diluições 10-3, 10-4 e 10-5, inoculando nos meios semi-sólidos JNFb, seletivo para *Herbaspirillum* (Döbereiner et al., 1995) e JMV, seletivo para *Burkholderia* (Baldani, comunicação pessoal), com 2 repetições por tratamento. Os tratamentos foram os seguintes: parte aérea, raiz lavada e raiz estéril (após tratamento com cloramina-T a 1% por 1 minuto, nas colheitas 1 e 2, e 15 minutos, na colheita 3), conforme metodologia citada para esterilização proposta por Döbereiner et al. (1995). Analisando as tabelas c, d e e, pôde-se notar que a dinâmica das populações bacterianas foi muito variável, de  $10(3)$  a  $10(6)$  células por grama de peso fresco. A população de diazotróficos aumentou com o crescimento dos genótipos de arroz. Na 3a coleta (tabela e), nos tratamentos de parte aérea e raiz, na maioria dos genótipos, houve formação de película em todas as diluições com o meio JNFb, isto é, as populações de bactérias presentes nos genótipos foram mais elevadas que  $10(6)$  células por grama de peso fresco. Importante notar que não houve diferenças entre os genótipos considerados eficientes (IR-42) e ineficientes (IAC-4440) para FBN. Isto é, as bactérias diazotróficas colonizaram todos os genótipos estudados. Provavelmente, as diferentes contribuições de FBN entre os genótipos devem ser devido a interações genótipos-bactérias diazotróficas, que devem ser melhor estudadas. Na 2a coleta, os elevados valores do tratamento raiz estéril pode ser devido ao curto tempo (1 minuto) de tratamento de cloramina-T 1%, o que pode não ter eliminado totalmente as bactérias presentes na rizosfera. (tabela d).

Tabela c. Contagem de bactérias diazotróficas 30 dias após emergência (dae) do arroz.

Genótipo	Raiz lavada		Raiz estéril		Parte aérea	
	JNFb	JMV	JNFb	JMV	JNFb	JMV
CNA 6807	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$
IAC 4440	$1,5 \times 10^5$	$<10^3$	$5,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$
CICA 8	$1,1 \times 10^5$	$7 \times 10^3$	$2,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	$+8,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
IAPAR 58	$2,5 \times 10^5$	$<10^3$	$2,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$
CNA 6808	$6,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^4$
CNA 6444	$+8,3 \times 10^5$	$<10^3$	$1,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$
METICA 1	$3,2 \times 10^5$	$5,3 \times 10^3$	$9,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$8,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$
IR-42	$9,5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^4$
MG 1	$6,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$7,7 \times 10^4$
GUARANY	$5,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$4,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$

Tabela d. Contagem de bactérias diazotróficas 60 dias após emergência (dae) do arroz.

Genótipo	Raiz lavada		Raiz estéril		Parte aérea	
	JNFb	JMV	JNFb	JMV	JNFb	JMV
CNA 6807	$1,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$+2,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
IAC 4440	$4,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$9,9 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$
CICA 8	$9,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$
IAPAR 58	$3,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
CNA 6808	$2,4 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$+1,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$
CNA 6444	$1,0 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
METICA 1	$6,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$
IR-42	$2,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$
MG 1	$8,3 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$5,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$
GUARANY	$7,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$9,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$

Tabela e. Contagem de bactérias diazotróficas 90 dias após emergência (dae) do arroz.

Genótipo	Raiz lavada JNFb	Raiz estéril		Parte aérea	
		JNFb	JMV	JNFb	JMV
CNA 6807	$+1,4 \times 10^6$	$4,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	$+1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
IAC 4440	$+1,4 \times 10^6$	$7,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$+2,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^4$
CICA 8	$+1,3 \times 10^6$	$9,4 \times 10^3$	$8,3 \times 10^4$	$+2,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
IAPAR 58	$+1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$+1,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$
CNA 6808	$+1,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$+1,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$
CNA 6444	$+1,3 \times 10^6$	$5,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$+1,4 \times 10^6$
METICA 1	$+1,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$
IR-42	$+1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
MG 1	$+1,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
GUARANY	$+2,3 \times 10^6$	$3,3 \times 10^4$	$3,8 \times 10^5$	$+2,1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^3$

## Quantificação da FBN em arroz de sequeiro com e sem a inoculação de bactérias diazotróficas

### Experimento de Vasos Contendo $^{15}\text{N}$

Os resultados obtidos no experimento de vasos contendo marcação estável de  $^{15}\text{N}$  avaliados 130 dias após o plantio mostraram que a inoculação promoveu um aumento de todos os parâmetros analisados. As estirpes homólogas isoladas de raízes esterilizadas de arroz e previamente selecionadas no experimento "in vitro" e em casa de vegetação (ZAE 67, ZAE 94, M 130 e M209) foram superiores as demais estirpes utilizadas, proporcionando um aumento de até 20% na porcentagem de N provenientes da fixação. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, a inoculação foi benéfica para todos os parâmetros analisados independentemente das estirpes utilizadas. (Tabela 1) o que pode refletir numa melhor qualidade dos grãos. Quanto a produção de grãos a estirpe M 209 de *Burkholderia sp.* foi estatisticamente melhor, com uma produção de 3,33 g/vaso o que correspondeu a um aumento de 60% em relação a testemunha. As plantas

inoculadas com esta estirpe também produziram grãos de melhor qualidade, pois acumularam maior quantidade de nitrogênio nos grãos. Entretanto não houve diferença entre as demais estirpes utilizadas (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito da inoculação de diferentes estirpes de *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* sp. na parte aérea de arroz, crescido em vasos com solo marcado com  $^{15}\text{N}$  (média de 4 repetições).

TRAT.	P. fresco g/vaso	P.seco g/vaso	N-total mgN/vaso	% N	$^{15}\text{N}$ exces	% N fix.
Controle	16,21a	4,46b	23,37b	0,52b	0,044	0
sp 109 <sup>3</sup>	18,68a	5,58ab	31,17ab	0,56ab	0,037	17,3
Z 67 <sup>1</sup>	21,53a	6,60a	37,49a	0,57ab	0,037	18,6
Z 94 <sup>1</sup>	19,97a	5,56ab	31,51ab	0,57ab	0,038	17,2
M 4 <sup>2</sup>	17,76a	5,18ab	28,80ab	0,55ab	0,040	10,2
M 130 <sup>4</sup>	19,80a	5,68ab	34,43a	0,60a	0,037	20,0
M 209 <sup>4</sup>	17,82a	4,77b	24,02b	0,50b	0,040	11,3
CV %	12,47	12,49	12,98	2,73		

1- Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* isoladas de raízes esterilizadas de arroz.

2- Estirpe de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

3- Estirpe de *Azospirillum brasilense* isolada de raízes esterilizadas de arroz.

4- Estirpes de *Burkholderia* sp. isoladas de arroz.

Tabela 2. Efeito da inoculação de diferentes estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* sp. na produção de grãos de arroz crescido em vasos com solo marcado com  $^{15}\text{N}$  (média de 4 repetições).

TRAT.	P. fresco g/vaso	P. seco g/vaso	N-total mg/vaso	% N	$^{15}\text{N}$ exces	% N fix.
Controle	2,26c	2,01bc	24,38bc	1,21bc	0,046	0
sp 109 <sup>3</sup>	2,49bc	1,75c	22,47c	1,29ab	0,042	8,23
Z 67 <sup>1</sup>	2,92b	2,39b	31,72ab	1,33a	0,044	4,35
Z 94 <sup>1</sup>	2,86bc	2,46b	31,21ab	1,27ab	0,043	3,48
M 4 <sup>2</sup>	2,64bc	2,30bc	28,90bc	1,26ab	0,045	1,87
M 130 <sup>4</sup>	2,90bc	2,57b	32,06ab	1,24abc	0,044	3,82
M 209 <sup>4</sup>	4,02a	3,33a	38,12a	1,14c	0,044	3,85
CV %	9,7	10,92	11,63	3,92		

O número de bactérias presentes no solo antes do plantio ( $2,5 \times 10^3$  células/g solo), foi provavelmente responsável pela presença das bactérias encontradas no tratamento controle.

## 5. Literatura citada

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.433-439, 1980.



- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- DÖBEREINER, J.; GARCIA DE SALOMONE, I. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1995. p.282-294.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkely, CA : Univ. of California, 1951. p.1-32 (California Agriculture Experiment Station. Circular, 347).
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Essex, v.3, p.223-228, 1985.
- REED, A.J.; BELOW, F.E. ; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and proteases activities during grain development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1179-1183. 1980.
- RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, Berlin, v.125, p.201-211, 1975.